

Aus der Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. Labhart) der Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. P. H. Rossier) der Universität Zürich
Arbeit unter der Leitung von Dr. P. Bally und P. D. Dr. E. R. Froesch

Zur Pharmakologie der Lipolysehemmung

Wirkungsweise adenosinhaltiger Nucleoside und Nucleotide auf die Lipolyse des Fettgewebes in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
Hannes Kappeler
von Fischingen

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. P. H. Rossier und Prof. Dr. A. Labhart

Zürich 1966
Buchdruckerei Georg Appl, Wemding

Aus der Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. Labhart) der Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. P. H. Rossier) der Universität Zürich
Arbeit unter der Leitung von Dr. P. Bally und P. D. Dr. E. R. Froesch

Zur Pharmakologie der Lipolysehemmung

Wirkungsweise adenosinhaltiger Nucleoside und Nucleotide auf die Lipolyse des Fettgewebes in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
Hannes Kappeler
von Fischeningen

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. P. H. Rossier und Prof. Dr. A. Labhart

Zürich 1966

Buchdruckerei Georg Appl, Wemding



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507221_0077

Zur Pharmakologie der Lipolysehemmung*

I. Wirkungsweise adenosinhaltiger Nucleoside und Nucleotide auf die Lipolyse des Fettgewebes in vitro

H. KAPPELER

Aus der Stoffwechselabteilung (Leitender Arzt: Prof. A. LABHART) der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. P. H. ROSSIER) der Universität Zürich

Eingegangen am 27. Januar 1966

Pharmacology of inhibition of lipolysis. I. Mode of action of adenosine containing nucleosides and nucleotides in lipolysis of adipose tissue in vitro.

Summary. — 1. Glycerol and free fatty acid release by adipose tissue in vitro is inhibited by nucleotides and nucleosides. This effect is particularly pronounced when the tissue is under lipolytic stimulation by glucagon. — 2. ATP, ADP, AMP, cyclic AMP and adenosine are equally effective. Adenine and ribose alone or together are ineffective. — 3. Dinucleotides (DPN, DPNH, TPN, TPNH) and coenzyme A inhibit lipolysis more markedly than adenosine and its mononucleotides. — 4. A small but significant inhibition of lipolysis is observed at an adenosine concentration of 10^{-5} M and the inhibition becomes maximal at 10^{-4} M. After the disappearance of the nucleotides from the medium lipolysis again picks up. — 5. Adipose tissue dephosphorylates ATP to ADP, AMP and adenosine. Dephosphorylation of ATP to ADP and of AMP to adenosine takes place only in the presence of tissue, whereas ADP is dephosphorylated to AMP in a medium in which tissue had been preincubated. Dephosphorylation of ATP is independent of lipolytic stimulation of the tissue. — 6. ATP stimulates the uptake of glucose- $U-^{14}C$ and its incorporation into tissue fatty acids, glycogen and $^{14}CO_2$. Oxidation of glucose- $6-^{14}C$ to $^{14}CO_2$ is inhibited by ATP. — 7. The ratio of lactic to pyruvic acid in the incubation medium is lowered by glucagon and normalized by nucleotides. — 8. The mode of action of nucleotides is discussed.

Pharmacologie de l'inhibition de la lipolyse. I. Mode d'action des nucléosides et des nucléotides contenant de l'adénosine sur la lipolyse du tissu adipeux in vitro.

Résumé. 1. Les nucléotides et nucléosides inhibent la production du glycérol et des acides gras libres par le tissu adipeux in vitro indépendamment de la présence de glucose. Cet effet est particulièrement prononcé quand la lipolyse est stimulée par le glucagon. — 2. L'inhibition de la lipolyse par les nucléotides ATP, ADP, AMP, AMP cyclique et l'adénosine est semblable. L'adénine et le ribose, seuls ou ensemble, n'agissent pas. 3. L'effet des dinucléotides (DPN, DPNH, TPN, TPNH) et du coenzyme A est plus fort que celui de l'adénosine et de ses mononucléotides. — 4. A une concentration d'adénosine de 10^{-5} M l'effet est petit mais déjà significatif et il devient maximal à une concentration de 10^{-4} M. Quand les nucléotides disparaissent du milieu d'incubation la lipolyse reprend. — 5. Le tissu adipeux transforme ATP en ADP, AMP et adénosine. La déphosphorylation de l'ATP en ADP et de l'AMP en adénosine se produit seulement en présence du tissu tandis que le tissu semble produire un enzyme qui est capable de déphosphoryler l'ADP en AMP dans le milieu d'incubation. La rapidité avec laquelle l'ATP est

transformé ne dépend pas de l'activité de la lipolyse. — 6. La captation du glucose- $U-^{14}C$ et son incorporation dans le $^{14}CO_2$, les acides gras du tissu et le glycogène sont augmentées par l'ATP tandis que l'oxydation du glucose- $6-^{14}C$ en $^{14}CO_2$ est abaissée. — 7. Le glucagon fait descendre le quotient acide lactique sur acide pyruvique dans le milieu d'incubation et les nucléotides normalisent ce quotient. — 8. Les possibilités du mode d'action des nucléotides sont discutées.

Zusammenfassung. 1. Nucleotide und Nucleoside hemmen, unabhängig von Glucose im Medium, die Fettsäure- und Glycerin-Freisetzung des Fettgewebes in vitro. Diese Lipolysehemmende Wirkung wird bei gleichzeitiger Stimulation durch Glucagon besonders deutlich. — 2. ATP, ADP, AMP, cyclisches AMP und Adenosin hemmen die Lipolyse gleich stark. Adenin, Ribose oder Adenosin und Ribose zusammen hemmen die Lipolyse nicht. — 3. Dinucleotide (DPN, DPNH, TPN, TPNH) und Coenzym A hemmen die Lipolyse etwas stärker als Adenosin und adenosinhaltige Mononucleotide. — 4. Die kleinste noch signifikante Wirkung erfolgt bei einer Adenosinkonzentration von 10^{-5} M, die maximale Hemmung bei 10^{-4} M. Nach Verschwinden der Nucleotide aus dem Medium kommt die Lipolyse wieder in Gang. — 5. Dem Medium zugefügtes ATP wird durch das Fettgewebe zu ADP, AMP und Adenosin dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von ATP zu ADP und von AMP zu Adenosin erfolgt nur in Anwesenheit von Gewebe. Dagegen scheint das Fettgewebe ein Enzym in das Medium abzugeben, das ADP zu AMP dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von ATP erfolgt gleich schnell, ob das Fettgewebe lipolytisch stimuliert wird oder nicht. — 6. ATP steigert die Glucoseaufnahme und den Einbau uniform markierter Glucose in die Gewebe-FS, das Glykogen und $^{14}CO_2$. Die Oxydation von Glucose- $6-^{14}C$ zu $^{14}CO_2$ wird durch ATP gehemmt. — 7. Durch Glucagon wird der Milchsäure/Brenztraubensäure-Quotient im Inkubationsmedium erniedrigt, durch Nucleotide wieder normalisiert. — 8. Die möglichen Wirkungsweisen der Nucleotide werden diskutiert.

* Ich bin den Herren Dr. P. R. BALLY und P. D. Dr. E. R. FROESCH für die Leitung dieser Arbeit und Herrn Professor A. LABHART für seine wertvollen Ratschläge zu bestem Dank verpflichtet.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Barrell Stiftung und des Schweizerischen Nationalfonds (Fonds No. 2803) durchgeführt.

Der Firma Sandoz sei für die persönliche finanzielle Unterstützung bestens gedankt.

Kristallines Glucagon (Lot No. 258—234B—167—1) wurde uns von Herrn Dr. W. M. MIKULASCHECK der Firma Eli Lilly und Co., Indianapolis, zur Verfügung gestellt.

Die Bedeutung der freien Fettsäuren als Betriebsstoffe ist allgemein anerkannt. Nach RANDLE et al. [22] konkurrieren die freien Fettsäuren mit der Glucose als Betriebsstoffe der Muskulatur und anderer Gewebe. Andererseits sind die freien Fettsäuren im Blut oft schon im Frühstadium des Diabetes mellitus, wenn der Glucosestoffwechsel noch nicht meßbar gestört ist, erhöht [22]. Diese Befunde führten zur Hypothese, daß die freien Fettsäuren im Blut ursächlich an der Entstehung des Diabetes beteiligt sein könnten [22]. Da die freien Fettsäuren fast ausschließlich aus den Triglyceriden des Fettgewebes stammen, ist es nicht verwunderlich, daß auf die Lipolyse des Fettgewebes und die Möglichkeiten ihrer Beeinflussung durch Hormone und Pharmaka vermehrtes Augenmerk gerichtet wurde.

Die Lipolyse des epididymalen Rattenfettgewebes wird, wie DOLE [5, 6] nachweisen konnte, durch Erythrocytenhaemolysat oder Homogenat von Geweben mit hohem Ribonucleinsäuregehalt teilweise gehemmt. Diese Wirkung dürfte auf die bei der Haemolyse oder Homogenisation freigesetzten Nucleotide und Ribonucleinsäuren zurückzuführen sein, da auch durch Zugabe von Ribonucleinsäuren, Nucleotiden oder Nucleosiden die Lipolyse in vitro gehemmt wird. DOLE [6] wies ebenfalls auf eine „insulinähnliche“ Wirkung der genannten Substanzen hin, da durch Ribonucleinsäuren die Oxydation der Glucose und ihr Einbau in die Triglyceride gefördert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von ATP auf in vitro inkubiertes Fettgewebe geprüft und mit derjenigen anderer Nucleoside und Nucleotide verglichen. Die Prüfung der Lipolysehemmung durch Nucleotide wird erleichtert durch Verwendung von Fettgewebe, dessen lipolytische Aktivität hormonell stimuliert wird. DOLE [5, 6] verglich in seiner Arbeit verschiedene lipolytische Hormone miteinander und fand keine signifikanten Unterschiede der Hemmung durch Nucleotide. Wir verwendeten als lipolytisches Agens Glucagon.

Während es uns in dieser Arbeit gelang, die Wirkungen von ATP und andern Nucleotiden auf den Fettgewebestoffwechsel aufzuklären, bleibt der Angriffspunkt und die Wirkungsweise dieser Substanzen ungeklärt. Einige in dieser Arbeit enthaltenen Resultate wurden für eine Übersichtsarbeit verwendet [4].

Material und Methoden

Abkürzungsverzeichnis:

AMP	= Adenosin-5'-monophosphat
ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
Co A	= Coenzym A
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	= Diphosphopyridinnucleotid, reduziert
GDH	= Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
GK	= Glycerokinase
TPN	= Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	= Triphosphopyridinnucleotid, reduziert
BTS	= Brenztraubensäure

CO ₂	= Kohlendioxyd
FS	= Fettsäure
FFS	= Freie Fettsäure
MS	= Milchsäure
P _i	= anorganisches Phosphat
PP _i	= Pyrophosphat

In Anlehnung an die von HUMBEL [16] an der Medizinischen Klinik Zürich eingeführte biologische Bestimmungsmethode für Insulin [9] wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

Rein gezüchtete, gefütterte Osborn-Mendel-Ratten zwischen 120–150 g wurden geköpft und das epididymale Fettgewebe so rasch als möglich entnommen. Das Gewebe von 12 Ratten wurde gleichmäßig auf 12 Warburggefäße verteilt, so daß jedes Gefäß ungefähr gleichviel Gewebe jeder einzelnen Ratte enthielt. In einigen Versuchen wurde ein derartiger „Pool“ von 16 oder mehr Ratten hergestellt.

Der mit 95% O₂ – 5% CO₂ gesättigte Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer [29] enthielt 4–6 g Albumin¹ und 100 mg Glucose pro 100 ml. Die 2-stündige Inkubation erfolgte bei 37°C. Die Gefäße wurden vor und nach Zugabe des Fettgewebes gewogen und alle Resultate auf das Feuchtgewicht des Gewebes bezogen.

Mehrfach rekristallisiertes Glucagon wurde in Glycin-NaOH-Puffer (pH 9.2) gelöst und bei 4°C nicht länger als 2 Wochen aufbewahrt. In allen Versuchen wurde das im Glucagon vorhandene Insulin (ca. 0.2⁰/₁₀₀) durch Anti-Rinderinsulin-Meerschweinchenserum [9] (0.1 ml pro 5 ml Inkubationsmedium mit einem Neutralisationsvermögen von 100 mE Insulin) inaktiviert.

Nucleotide, Nucleoside, Basen, Ribose und Coenzym A wurden von der Firma C.F. Boehringer, Söhne, Mannheim, bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Diese Substanzen wurden für jeden Versuch frisch in Krebs-Ringer-Albumin-Puffer gelöst.

Glucose wurde enzymatisch nach BERGMAYER und BERNT [2] bestimmt.

Glycerin wurde mit der enzymatischen Methode von WIELAND [32] gemessen. Die Methode wurde insofern modifiziert, als alle zur Bestimmung nötigen Co-faktoren und Enzyme von Anfang an gemischt wurden.

Die Bestimmungen der Milchsäure, Brenztraubensäure, von ATP, ADP, AMP und Glycerophosphat wurden nach den Methoden der Firma Boehringer, Söhne, Mannheim, durchgeführt. Alle Bestimmungen erfolgten im Doppel.

In einigen Versuchen wurde Glucose-U-¹⁴C sowie Glucose-6-¹⁴C (Radiochemical Center, Amersham, Buckinghamshire, England) in einer Menge von 1 µg pro Fläschchen zugegeben.

Kohlendioxyd wurde als Bariumcarbonat gefällt, planchettiert und in einem fensterlosen Fließzähler gezählt. Die spezifische Aktivität der Glucose wurde mittels der Bildung des Glucosazons bestimmt.

Die Totallipide im Gewebe wurden nach FOLCH et

¹ Das hochgereinigte Albumin (Fraktion 5) des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes, Bern, enthielt 20 µAeq FFS/g.

al. [7] extrahiert und mit Isooctan-99%igem Eisessig (1:1, v/v) gereinigt. Die Fettsäuren wurden durch alkalische Hydrolyse aus den Totallipiden freigesetzt und mit Aether extrahiert. Totallipide und Fettsäuren wurden planchettiert und gezählt. Die freien Fettsäuren wurden nach GORDON [13] titriert.

Das getrocknete, fettfreie Gewebe wurde in 30%-iger KOH hydrolysiert und das Glykogen in 70%-igem Ethanol bei 4°C 5mal gefällt und dann durch Sog auf Filterpapier gebracht und gezählt. Eine vollständige Praecipitation wurde durch Zugabe von 5 mg Träger-Glykogen erzielt.

Resultate

A. Stoffwechselwirkungen von Glucagon und ATP

1. Beziehungen zwischen Abgabe von Glycerin und FFS und deren Wiederveresterung. Unter unseren Versuchsbedingungen werden ohne Hormonzusatz 8.00 ± 0.08 μMol Glycerin/g/2 h in das Medium abgegeben. Gleichzeitig erfolgt kein Anstieg der FFS im Medium. Wirkt ein lipolytisches Hormon auf das Fettgewebe in vitro ein, so gibt dieses mehr Glycerin und mehr FFS (Abb. 1) ab.

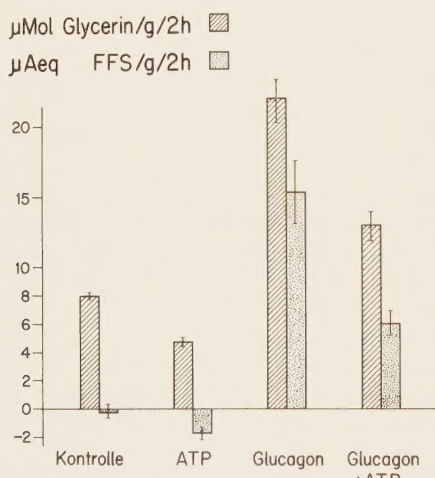


Abb. 1. Wirkung von ATP auf die Freisetzung von Glycerin und FFS aus dem epididymalen Rattenfettgewebe in vitro. Die Säulen stellen die Mittelwerte von 14 (Glycerin) bzw. 10 (FFS) Experimenten dar; der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als Klammer eingezeichnet. Inkubationsbedingungen: Pro Gläschen 3 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit 6 g Albumin und 100 mg Glucose pro 100 ml. Glucagon war in der Konzentration von $0.1 \mu\text{g/ml}$, ATP in einer Konzentration von 5×10^{-4} M vorhanden

2. Hemmung der Lipolyse durch ATP. Glycerin- und Fettsäure-Freisetzung werden durch ATP stark gehemmt (Abb. 1). Hierbei werden mehr Fettsäuren aus dem Medium aufgenommen und wiederverestert als abgegeben, so daß netto eine Aufnahme von FFS aus dem Medium resultiert. Die Wirkung des ATP zeigt sich noch deutlicher beim mit Glucagon stimulierten Gewebe.

In dem in Abb. 2 dargestellten Versuch wurde ATP 20 Minuten nach Inkubationsbeginn zugegeben. ATP setzt die Glycerinabgabe rasch herab, während überhaupt keine FFS mehr freigesetzt werden.

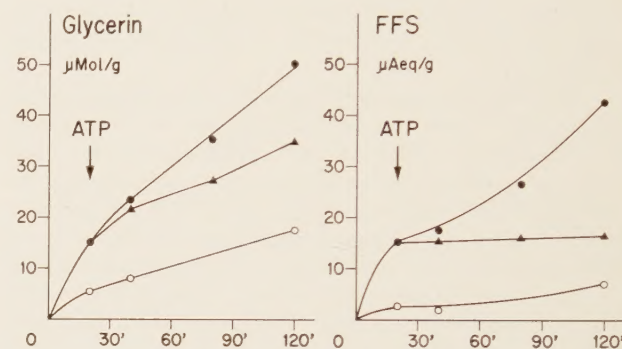


Abb. 2. Einfluß von Glucagon und ATP auf die Freisetzung von Glycerin und FFS aus dem epididymalen Rattenfettgewebe in vitro. Glucagon wurde von Anfang an, ATP erst 20 Minuten nach Inkubationsbeginn zugegeben. ○—○ Kontrolle; ●—● Glucagon ($0.1 \mu\text{g/ml}$); ▲—▲ Glucagon ($0.1 \mu\text{g/ml}$) + ATP (5×10^{-4} M). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 2 Inkubationen

3. Wirkung von ATP auf die Glucose-Aufnahme in Beziehung zur Lipolyse. Wie Tabelle 1 zeigt, erhöht ATP die Glucose-Aufnahme, allerdings nicht signifikant. Da diese aus der Abnahme der Glucose-Konzentration im Medium, d.h. aus der Differenz zweier Messungen errechnet wird, können kleine Differenzen nicht sehr genau erfaßt werden.

Tabelle 2 zeigt die Wirkung von ATP auf die Lipolyse, wenn Glucose im Inkubationsmedium fehlt. ATP wurde 15 Minuten nach Inkubationsbeginn aus dem Seitenarm zugegeben. Die Resultate entsprechen denen, die in Anwesenheit von Glucose erhalten wurden (vgl. Abb. 1 und 2). Für die Hemmung der Lipolyse durch ATP ist Glucose im Medium keine Voraussetzung.

4. Einbau von Glucose- $U^{14}\text{C}$ in Glykogen, CO_2 , Triglyceride und Bildung von Milchsäure. In Tabelle 3

Tabelle 1. Wirkung von ATP auf die Glucose-Aufnahme des epididymalen Rattenfettgewebes in vitro. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 1. Jeder Wert entspricht dem Mittel von 16 Inkubationen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist angegeben

Zugaben zum Inkubationsmedium	keine	ATP 5×10^{-4} M	Glucagon $0.1 \mu\text{g/ml}$	Glucagon + ATP $0.1 \mu\text{g/ml}$ 5×10^{-4} M
Glucoseaufnahme $\mu\text{Mol/g/2}$ Stunden				
Mittel $\pm$ mittlerer Fehler	10.8 ± 1.0	13.2 ± 1.4	14.2 ± 1.6	13.8 ± 1.1

P

n. s.

n. s.

Tabelle 2. Hemmung der Lipolyse durch ATP bei Inkubation ohne Glucose im Medium. Die übrigen Versuchsbedingungen sind gleich wie in Abb. 1. Die Freisetzung von Glycerin und FFS wurde während einer Stunde gemessen. Die Zugabe von ATP zum Medium erfolgt 15 Minuten nach Inkubationsbeginn

Zeit nach Inkubationsbeginn	Glycerin $\mu\text{Mol/g}$		FFS $\mu\text{Aeq/g}$	
	Glucagon 0.1 $\mu\text{g/ml}$	Glucagon + ATP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 5×10^{-4} M	Glucagon 0.1 $\mu\text{g/ml}$	Glucagon + ATP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 5×10^{-4} M
10 min	9.0	9.0	9.2	9.2
15 "	9.7	9.7	8.7	8.7
25 "	11.5	9.4	10.9	5.7
35 "	15.2	8.5	16.2	4.4
60 "	20.7	10.1	22.9	3.9

Tabelle 3. Einfluß von ATP und Glucagon auf den Stoffwechsel von Glucose-U- ^{14}C . Glucosekonzentration 100 mg/100 ml. Der totale Glucose-Einbau wurde aus den ausgeführten Stoffwechselgrößen berechnet. Die Resultate sind ausgedrückt als $\mu\text{Mol Glucose/g/2 Std.}$ Jeder Wert entspricht dem Mittel der Resultate von 4 Inkubationen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist angegeben

Zugabe zum Medium		keine	ATP 5×10^{-4} M	Glucagon 0.1 $\mu\text{g/ml}$	Glucagon + ATP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 5×10^{-4} M
1	CO_2	2.01 ± 0.14	2.95 ± 0.04	3.97 ± 0.21	4.04 ± 0.18
2	Triglyceride:				
	Glycerinanteil	1.83 ± 0.16	1.53 ± 0.06	4.43 ± 0.15	3.32 ± 0.35
	Fettsäureanteil	1.15 ± 0.16	2.30 ± 0.37	0.88 ± 0.10	1.91 ± 0.18
3	Glykogen	0.12 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.30 ± 0.03
4	Milchsäure	0.63 ± 0.05	0.98 ± 0.09	0.64 ± 0.09	1.04 ± 0.07
5	Totaler Glucose- Umbau (Summe 1—4)	5.74 ± 0.13	8.09 ± 0.80	9.99 ± 0.41	10.61 ± 0.74
p		< 0.005		n.s.	

sind die Resultate des Stoffwechsels von Glucose-U- ^{14}C zusammengefaßt.

Der Einbau von Glucose-U- ^{14}C in das Glycogen des Fettgewebes wird durch ATP um das Dreifache erhöht, während Glucagon das Gegenteil bewirkt. Unter Glucagon und ATP liegen die Werte ungefähr gleich hoch wie unter ATP allein (Tab. 3).

ATP stimuliert die Oxydation von Glucose-U- ^{14}C zu $^{14}\text{CO}_2$ signifikant. Glucagon und ATP zusammen wirken gleich stark wie Glucagon allein.

Sowohl ATP als auch Glucagon steigern den Einbau von Glucose-U- ^{14}C in die Triglyceride. Die Wirkungen von ATP und Glucagon addieren sich nicht. Während ATP den Einbau in den Fettsäureanteil der Triglyceride stimuliert und den Einbau in den Glycerinanteil nicht

signifikant vermindert, fördert Glucagon selektiv den Einbau in den Glycerinanteil der Triglyceride.

Durch ATP wird die Milchsäurebildung leicht gefördert, während sie durch Glucagon nicht verändert wird.

Die Addition der aufgeführten radioaktiven Stoffwechselprodukte der Glucose und der produzierten Milchsäure ergibt eine signifikante Stimulation des Glucose-Stoffwechsels sowohl durch ATP als auch durch Glucagon.

5. Einbau spezifisch markierter Glucose-6- ^{14}C in Triglyceride, CO_2 und FFS des Inkubationsmediums. Die Resultate in Tabelle 4 zeigen, daß der Einbau von Glucose-6- ^{14}C in die Triglyceride durch ATP stark und durch Glucagon weniger stimuliert wird.

Tabelle 4. Einfluß von ATP und Glucagon auf den Stoffwechsel von Glucose-6- ^{14}C . Gleiche Versuchsbedingungen wie in Tab. 3. Die Resultate sind als $\mu\text{Mol Glucose/g/2 Std.}$ ausgedrückt. Jeder Wert entspricht dem Mittel der Resultate von 8 Inkubationen $\pm$ mittleren Fehler des Mittelwertes

Zugabe zum Medium	keine	ATP 5×10^{-4} M	Glucagon 0.1 $\mu\text{g/ml}$	Glucagon + ATP 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 5×10^{-4} M
CO_2	0.81 ± 0.08	0.64 ± 0.02	1.83 ± 0.17	1.07 ± 0.05
Triglyceride:				
Glycerinanteil	2.20 ± 0.19	2.30 ± 0.56	3.50 ± 0.29	3.20 ± 0.42
Fettsäureanteil	2.50 ± 0.20	5.60 ± 0.57	1.97 ± 0.29	3.97 ± 0.45
FFS im Medium	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.13 ± 0.03

ATP stimuliert den Einbau in den Fettsäureanteil der Triglyceride und ändert den Einbau in den Glycerinanteil nicht signifikant. Glucagon fördert den Einbau in den Glycerinanteil und setzt den Einbau in den Fettsäureanteil herab. Die Oxydation von Glucose-C- 14 C zu 14 CO $_2$ wird durch ATP herabgesetzt und durch Glucagon stimuliert.

Unter Glucagon baut das Fettgewebe gegenüber der Kontrolle siebenmal mehr Glucose-6- 14 C in die FFS des Inkubationsmediums ein. ATP hingegen erniedrigt den Einbau von Glucose-6- 14 C in die FFS.

Die Radioaktivität der FFS geht unter allen Bedingungen der titrierten Menge der FFS parallel, sodaß die spezifische Aktivität der vom Fettgewebe abgegebenen FFS unter dem Einfluß von Glucagon, ATP oder beiden zusammen konstant bleibt.

B. Abbau von ATP während der Inkubation mit Fettgewebe

1. Abnahme der ATP-Konzentration im Medium und Dephosphorylierung zu ADP, AMP und Adenosin. Wie in Vorversuchen festgestellt wurde, verschwindet ATP in Anwesenheit von Fettgewebe sehr rasch aus dem Medium. Abb. 3 zeigt, daß die ATP-Abnahme im Medium gleich rasch erfolgt, ob das Fettgewebe mit Glucagon stimuliert wird oder nicht. Der Umbau des ATP durch das Fettgewebe scheint damit unabhängig vom Ausmaß der Lipolyse zu sein.

Während die Konzentration von ATP im Medium abnimmt, entsteht ADP und später AMP (Abb. 4). Die

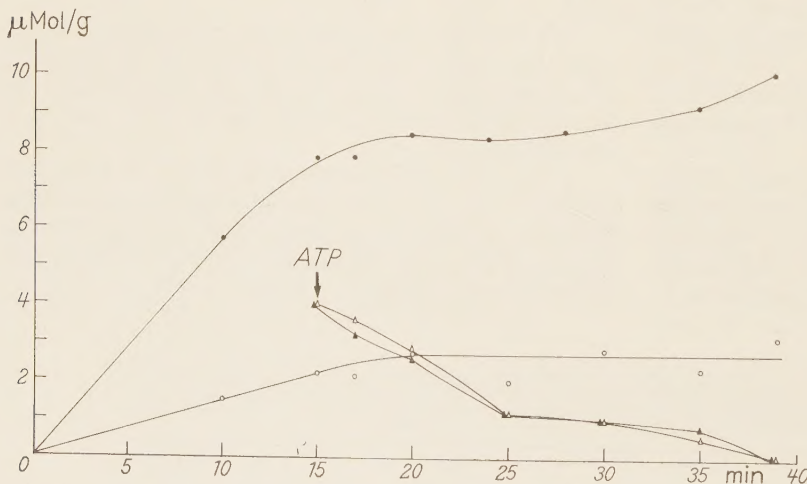


Abb. 3. Umsatz von ATP in Fettgeweibeinkubation mit und ohne Glucagon. Die eine Hälfte der Gläschen enthielt 5 µg Glucagon/ml. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde allen Gläschen ATP zugegeben und anschließend in Abständen von 5 Minuten die Konzentration des ATP im Medium bestimmt. Die Anfangskonzentration von ATP war 5×10^{-4} M. Die Resultate sind angegeben als µMol ATP bzw. Glycerin, die pro g umgesetzt bzw. abgegeben werden. ●—● Glycerin in Anwesenheit von Glucagon und ATP; ○—○ Glycerin in Anwesenheit von ATP; ▲—▲ ATP in Anwesenheit von Glucagon; △—△ ATP in Abwesenheit von Glucagon. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 2 Inkubationen

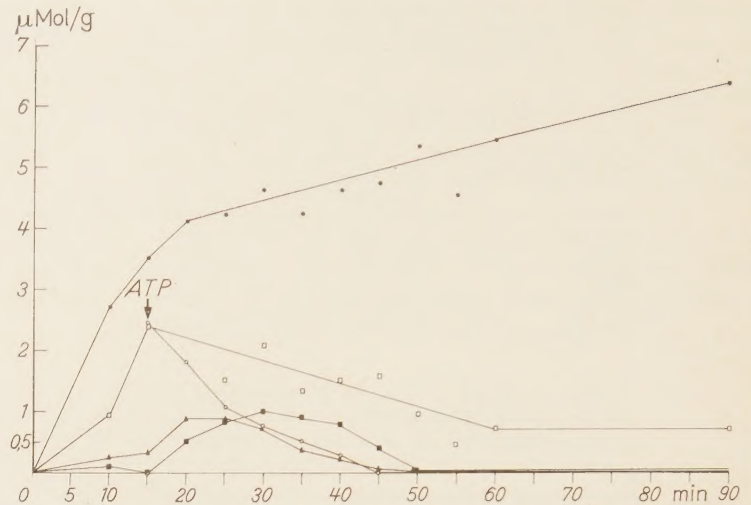


Abb. 4. Umbau von ATP durch das Fettgewebe in vitro. 15 Minuten nach Inkubationsbeginn wurde allen Gläschen ATP in einer Konzentration von 5×10^{-4} M zugefügt. Die Konzentration von ATP, ADP, AMP, Glycerin und FFS im Medium wurde in Abständen von 5 Minuten gemessen. ●—● Glycerin; □—□ FFS; ○—○ ATP; ▲—▲ ADP; ■—■ AMP; Inkubationsbedingungen wie in Abb. 1. Jeder Punkt entspricht dem Resultat von 2 Inkubationen. Die Resultate sind als µmol/g Fettgewebe ausgedrückt

sofort nach Zugabe von ATP auftretende Hemmung der Lipolyse bleibt auch nach völligem Verschwinden des ATP aus dem Medium bestehen (Abb. 3 und 4). Ähnliche Versuche, in denen ADP oder AMP anstelle von ATP zugegeben wurde, ergaben im wesentlichen dasselbe.

Da ATP zu ADP und dieses zu AMP dephosphoryliert werden, stellt sich die Frage, ob diese Dephosphorylierungen in den Fettgewebezellen oder an deren Membranen oder im Medium stattfinden. Die letztere Hypothese würde voraussetzen, daß das Gewebe ein Agens ins Medium abgibt, das die Reaktion ermöglichte.

Zur Abklärung dieser Frage wurde mit Fettgewebe vorinkubiertes Medium, dem anschließend Nucleotide zugefügt wurden, verwendet, (Tab. 5), und im Abstand von 10 Minuten der Nucleotidgehalt bestimmt.

Während sich die Konzentration von ATP und AMP im vorinkubierten Medium nicht signifikant ändert, wird ADP zu AMP dephosphoryliert. Dieser Prozeß findet im Medium, das nicht mit Fettgewebe vorinkubiert wurde, nicht statt (vgl. letzte Kolonne in Tab. 5). Während der Vorinkubation des Fettgewebes wird ein Agens in das Medium abgegeben das ADP in AMP umwandelt. Dabei spielt es keine Rolle, ob für die Vorinkubation ganze (Pad) oder zerteilte Fettgewebezettel (Pool) verwendet werden.

Tabelle 5. Dephosphorylierung von ADP in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, in dem vorgängig Fettgewebe inkubiert wurde. Zur Klärung der Frage, ob Fettgewebe ein Nucleotid-spaltendes Agens ins Inkubationsmedium abgibt, wurde Fettgewebe von 12 Ratten in 2 Fläschchen vorinkubiert. In den einen Fläschchen wurden ganze Pads, in den andern zerteilte Fettgewebezipfel („Pool“) inkubiert. Nach einstündiger Vorinkubation wurde das Medium durch Filtration vom Gewebe getrennt. Das vom Gewebe befreite Medium wurde in drei Teile aufgeteilt, und entweder ATP, ADP oder AMP zugegeben. In Abständen von 10 Minuten wurde der Nucleotidgehalt bestimmt. Die Resultate sind als mg Nucleotid/100 ml Puffer angegeben. Jeder Wert entspricht dem Mittel von 2 Bestimmungen

Minuten	ATP mg/100 ml		AMP mg/100 ml		ADP mg/100 ml		ADP mg/100 ml keine Vorinkubation
	„Pad“	„Pool“	„Pad“	„Pool“	„Pad“	„Pool“	
0	58.8	63.8	53.5	54.6	52.6	48.2	49.3
10	58.2	60.8	53.5	60.3	46.0	38.5	51.0
20	57.1	60.5	51.2	61.8	38.9	30.9	50.0
30	54.6	56.0	52.2	60.9	33.1	22.1	52.2
40	54.9	52.0	51.6	62.1	29.6	21.2	52.2
50	54.0	52.0	50.7	59.7	25.6	20.8	52.9
60	51.2	—	50.7	58.3	24.3	17.2	54.4

C. Vergleich verschiedener adenosin-haltiger Nucleotide und Verhältnis zwischen Konzentration und Wirkung

1. Vergleich der Lipolyse-Hemmung durch verschiedene Nucleotide. ADP, AMP, cyclisches AMP und Adenosin hemmen die Lipolyse gleich stark wie ATP (Abb. 5). Adenin, Ribose und Adenin und Ribose zusammen hemmen die Lipolyse hingegen nicht. Als kleinste Einheit scheint das Adenosinmolekül wirksam zu sein.

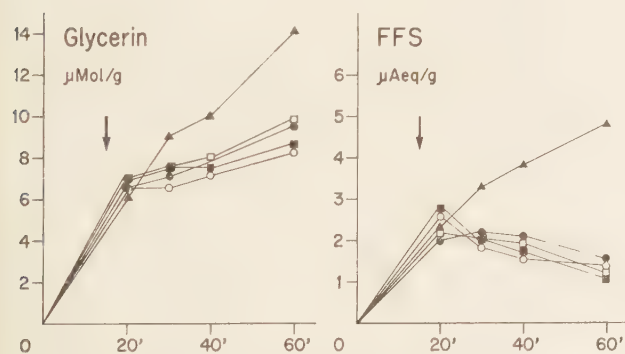


Abb. 5. Wirkung von ATP, ADP, AMP und Adenosin auf die Glycerin- und FFS-Freisetzung aus dem Fettgewebe in vitro. Nach einer Vorinkubation von 15 Minuten mit 0.1 µg Glucagon/ml Inkubationsmedium wurden die verschiedenen Nucleotide und Nucleoside in einer Konzentration von 5×10^{-4} M zugegeben. ▲—▲ Kontrolle; ○—○ ATP; ●—● ADP; ■—■ AMP; □—□ Adenosin. Jeder Punkt entspricht dem Resultat von 2 Inkubationen

Dinucleotide und Coenzym A hemmen die Lipolyse noch etwas stärker als Adenosin (Tab. 6).

2. Verhältnis von Konzentration zu Wirkung. Die Wirkung verschiedener Adenosin-Konzentrationen über den Bereich von 10^{-8} bis 10^{-2} M auf die Glycerin- und Fettsäure-Freisetzung wurde geprüft.

Tabelle 6. Wirkung verschiedener Nucleotide, Dinucleotide, Coenzyme und Busen auf die Lipolyse des Fettgewebes. Jede Substanz wurde mindestens 4 Mal geprüft. Um die Resultate der einzelnen Versuche vergleichen zu können, wurden alle Resultate auf die Wirkung von Adenosin bezogen, dessen Wirkung in jedem Versuch mitgeprüft und das als Standard verwendet wurde. Die Resultate sind in Prozenten der Kontrollinkubation ohne Nucleotidzugabe, deren Resultate als 100% angenommen wurden, angegeben. Alle Versuche wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt: Der Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer enthielt 4 g Albumin und 100 mg Glucose pro 100 ml Glucagon war in einer Konzentration von 0.1 µg/ml vorhanden

Zugabe zum Medium	Glycerinabgabe in % des Ausgangswertes unter Glucagon Mittelwert ± mittlerer Fehler	Abgabe von F.F.S. in % des Ausgangswertes unter Glucagon Mittelwert ± mittlerer Fehler
keine	100% ± 5%	100% ± 7%
Adenosin	50% ± 1%	25% ± 4%
AMP	50% ± 2%	33% ± 3%
ADP	46% ± 1%	27% ± 2%
cyclisches AMP	50% ± 2%	14% ± 2%
ATP	49% ± 1%	25% ± 2%
Coenzym A	39% ± 1%	7% ± 2%
DPN	46% ± 4%	26% ± 1%
DPNH	44% ± 2%	21% ± 2%
TPN	41% ± 1%	13% ± 3%
TPNH	39% ± 2%	32% ± 12%
Adenin	108% ± 3%	129% ± 5%
Ribose	111% ± 2%	117% ± 4%
Adenin + Ribose	111% ± 3%	135% ± 7%

Wie Abbildung 6 zeigt, wirkt Adenosin in den Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} M nur schwach hemmend auf die Lipolyse, während bei einer Konzentration von 10^{-4} M bereits die maximale Wirkung auftritt. Durch höhere Dosen wird keine stärkere Hemmung der Lipolyse erzielt.

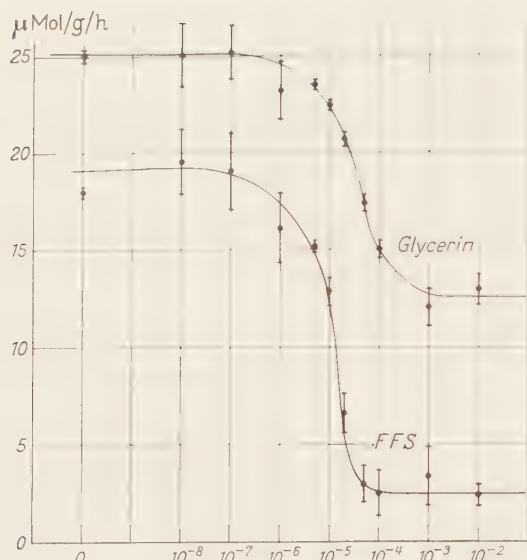


Abb. 6. Wirkung verschiedener Adenosin-Konzentrationen auf die Lipolyse. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 4 Experimenten; der mittlere Fehler des Mittelwertes ist als Klammer angegeben. Inkubationsbedingungen: 3 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit 6 g Albumin und 100 mg Glucose/100 ml. Inkubationszeit: 1 Stunde. Glucagon wurde allen Fläschchen in einer Konzentration von 0.3 µg/ml zugegeben

D. Zur Wirkungsweise der Nucleotide

1. *Änderung des Milchsäure/Brenztraubensäure-Quotienten durch Nucleotide.* In vitro inkubiertes Fettgewebe gibt neben FFS und Glycerin auch eine gewisse Menge Milchsäure und Brenztraubensäure ins Medium ab. Der Quotient MS/BTS ist ca. 10:1.

Unter Stimulation durch ein lipolytisches Hormon sinkt dieser bis auf 3:1 oder 2:1. Wird die Glucagonwirkung durch ein Nucleotid aufgehoben, so normalisiert sich der Quotient und beträgt wieder 10:1 oder mehr (Tab. 7). Unter dem Einfluß von Glucagon kommt es zu einer Zunahme von Brenztraubensäure im Medium, wodurch der Quotient erniedrigt wird. Nucleotide erniedrigen die Brenztraubensäurekonzentration, sodaß der Quotient MS:BTS ansteigt. Die Produktion von Milchsäure wird durch Glucagon und Nucleotide nicht signifikant verändert (Tab. 7).

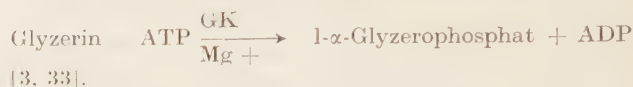
Diskussion

Die Lipolyse des Fettgewebes wird definiert als enzymatische Hydrolyse der Triglyceride in freie Fett-

säuren und Glycerin. Glycerin und ein Teil der FFS werden dabei in das albuminhaltige Medium abgegeben. Die Lipolyse geht im isolierten, überlebenden Fettgewebe ständig vor sich. Sie wird durch die sogenannten lipolytischen Hormone: ACTH, Adrenalin, Noradrenalin, STH und Glucagon stimuliert. (Referenzen bei STEINBERG und VAUGHAN [25].)

Während der größte Teil der freien Fettsäuren wieder verestert und als Triglyceride gespeichert wird, kann das Fettgewebe das anfallende Glycerin nicht mehr wiederverwenden (Referenzen bei LEBOEUF [20]), da ihm die Glycerokinase (GK) zu fehlen scheint [30].

Die GK katalysiert folgende Reaktion:



Glycerokinase wurde bis jetzt nur in Leber [3, 33], Niere [33], Darm [14] und dem braunen Fettgewebe [28] nachgewiesen.

Hingegen haben MARGOLIS und VAUGHAN [21] im Rattenfettgewebeshomogenat eine Transphosphorylase-Reaktion gefunden, die aus Glycerin + PP_i ⇌ l-α-Glycerophosphat + P_i bilden kann.

Dies dürfte vielleicht erklären, weshalb dem Medium zugegebenes Glycerin-¹⁴C doch in geringem Maße in die Gewebetriglyceride eingebaut wird. Die Glycerinaufnahme hält sich jedoch in so bescheidenem Maße, daß sie praktisch keine Rolle spielen dürfte. Da das freigesetzte Glycerin kaum mehr durch das Gewebe aufgenommen wird, ist die Glycerin-Abgabe ein genaues Maß der Lipolyse. Der Medium-Glycerin-Gehalt nimmt denn auch während der Inkubation als Funktion der Zeit linear zu.

Da der größte Teil des freigesetzten Glycerins aus Triglyceriden stammt (99% der Fette im Fettgewebe sind Triglyceride) [15], müßten theoretisch 3mal mehr FFS-Moleküle als Glycerinmoleküle freigesetzt werden. Bei Inkubationen mit Glucose werden aber immer viel tiefere Fettsäurewerte gefunden, da die aus den Triglyceriden hydrolysierten FFS, im Gegensatz zum Glycerin, durch das Fettgewebe wieder in die Triglyceride eingebaut oder zu CO₂ oxydiert werden. In der Leber [18, 19, 24] und im Fettgewebe [26] werden die hydrolysierten FFS mit l-α-Glycerophosphat wieder verestert. Somit ist die Wiederveresterung der FFS weitgehend von der zur Verfügung stehenden Menge

Tabelle 7. Wirkung von ATP, ADP, AMP, Adenosin und Glucagon auf die Milchsäure- und Brenztraubensäure-Konzentration im Medium. Jeder Wert entspricht dem Mittel von 4 Inkubationen. Versuchsbedingungen wie in Abb. 1

	Glucagon	Glucagon + ATP	Glucagon + ADP	Glucagon + AMP	Glucagon + Adenosin
Milchsäure µMol/g/2 Stunden	2.45	2.50	2.65	2.80	2.71
Brenztraubensäure µMol/g/2 Stunden	0.52	0.24	0.30	0.21	0.27
Quotient M.S./B.T.S.	4.7	10.4	8.8	13.3	10.0

1- α -Glycerophosphat abhängig. Die Bildung von 1- α -Glycerophosphat ihrerseits ist eng mit der Glucose-Aufnahme gekoppelt (Referenzen siehe Übersichtsarbeit [31]).

Steht dem Gewebe weder Glucose noch ein anderes glykolytisches Substrat zur Verfügung, so werden weniger FFS vom Gewebe aufgenommen, ihr Einbau in die Triglyceride ist vermindert und ihre Oxydation zu CO_2 vermehrt [1]. Jedoch können auch ohne Glucose im Medium bereits abgegebene FFS wieder ins Gewebe aufgenommen werden. Das für die Veresterung benötigte 1- α -Glycerophosphat stammt in diesem Falle vor allem aus den Glykogenreserven des Fettgewebes [23, 8, 10].

In einigen unserer Versuche zeigte es sich, daß die bereits freigesetzten FS vom Gewebe wieder aufgenommen und wiederverestert werden, nachdem das Nucleotid zugegeben wurde (Abb. 6 und 8). Da Abgabe und Aufnahme von FFS lediglich die Bilanz von Lipolyse und Wiederveresterung widerspiegeln, bedeutet dies ein Überwiegen der Wiederveresterung über die gehemmte Lipolyse. Nucleotide und Nucleoside setzen nicht nur die Fettsäurefreisetzung, sondern auch die Glycerinfreisetzung des Fettgewebes *in vitro* herab.

Es kann sich bei dieser „Lipolysehemmung“ aus folgenden Gründen nicht um eine vermehrte Wiederveresterung mit 1- α -Glycerophosphat handeln:

1. Ändert sich bei vermehrter Wiederveresterung der FFS mit 1- α -Glycerophosphat die Glycerinfreisetzung nicht.

2. Wird der Einbau markierter Glucose in den Glycerinanteil der Triglyceride durch Nucleotide nicht erhöht, und

3. ist die Anwesenheit von Glucose im Medium nicht Voraussetzung für die lipolysehemmende Wirkung der Nucleotide.

Eine vermehrte Wiederveresterung mit 1- α -Glycerophosphat scheidet folglich als Erklärung der Nucleotidwirkung aus.

Eine Hemmung der Glycerinabgabe des Fettgewebes wird nicht nur mit den hier untersuchten Nucleotiden sondern auch noch mit mehreren anderen Substanzen erzielt. Nicotinsäure wirkt noch stärker lipolysehemmend als die Nucleotide [4]. Insulin kann unter gewissen Umständen die Glycerinabgabe des Fettgewebes *in vitro* stark drosseln. Das Fettgewebe von Ratten, die während mehreren Tagen fasten und dann 24 Stunden lang mit kohlenhydratreicher Nahrung wiedergefüttert werden, gibt sehr viel Glycerin an das Medium ab. Kleine Mengen Insulin hemmen die Glycerinabgabe dieses Gewebes um mehr als 80% des Ausgangswertes in Abwesenheit von Glucose im Medium [10]. 5-Methyl-3-Pyrazolcarbonsäure beeinflusst das Gewebe wiedergefütterter Ratten genau gleich wie Insulin. Die Abgabe von Glycerin wird gehemmt, die Glykogenreserven geschont und weniger Brenztraubensäure ins Medium abgegeben, sodaß das Verhältnis von MS:BTS ansteigt [10]. Unter gewissen Umständen

wirkt Insulin in Abwesenheit von Glucose auch auf das lipolytisch stimulierte [17] und das diabetische Fettgewebe [27] lipolysehemmend.

Der Mechanismus der Lipolysehemmung durch Nucleotide ist noch nicht geklärt. Zwei Möglichkeiten stehen offen: Erstens eine Hemmung eines lipolytischen Systems und zweitens eine Förderung der Wiederveresterung der Mono- und Diglyceride mit aktivierten Fettsäuren. Im letzteren Fall müßte man annehmen, daß diese Substanzen zu Coenzym A aufgebaut oder dessen Synthese fördern würden, so daß die FFS schneller aktiviert und damit Di- und Monoglyceride in vermehrtem Ausmaß zu Triglyceriden verestert würden. Es ist nun allerdings kaum vorstellbar, daß Fettgewebe die Fähigkeit hat, alle vorher erwähnten Substanzen für die Bildung von Coenzym A zu verwenden. Mit der Hemmung einer Lipase könnten alle Wirkungen der Nucleotide erklärt werden.

Während Insulin, Nicotinsäure und 5-Methyl-3-Pyrazolcarbonsäure die Glycerinabgabe des Fettgewebes *in vitro* während längerer Zeit total blockieren, erschöpft sich die Wirkung des Adenosins, da dieses vom Gewebe abgebaut wird.

Die lipolytischen Enzyme sind wahrscheinlich nahe bei der Zellmembran lokalisiert oder sogar Bestandteile derselben. Eine allosterische, nicht kompetitive Hemmung dieser Enzyme durch diese sehr verschiedenartigen Substanzen könnte unsere Beobachtungen am Fettgewebe *in vitro* am besten erklären.

Neben der Lipolyse-Hemmung stimulieren Nucleotide die Glucose-Aufnahme und die FS-Synthese aus Glucose (vgl. Tab. 3 und 4). Diese Wirkungen sind prozentual gesehen geringer als die Lipolyse-Hemmung. Wie erwartet, sinkt unter ATP der Bedarf an 1- α -Glycerophosphat für die Wiederveresterung der FFS und dementsprechend ist der Einbau von Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$ in den Glycerinanteil der Triglyceride unter ATP kleiner als ohne ATP (Tab. 3). Da unter dem Einfluß von ATP weniger Dihydroxyaceton-Phosphat zu 1- α -Glycerophosphat reduziert wird, steht mehr DPNH für die Reduktion von BTS zu MS zur Verfügung. Deshalb scheint der Quotient MS/BTS in Anwesenheit von Nucleotiden anzusteigen [10].

Parallel zur vermehrten Fettsäuresynthese aus Glucose wird die Oxydation von Glucose- $\text{U-}^{14}\text{C}$ zu $^{14}\text{CO}_2$ durch Nucleotide stimuliert, während die Oxydation von Glucose-6- ^{14}C zu $^{14}\text{CO}_2$ stark erniedrigt wird. Auch diese Wirkungen der Nucleotide sind denjenigen des Glucagons [11] entgegengesetzt.

Da zugegebenes ATP in ADP, AMP und Adenosin dephosphoryliert wird, und andererseits kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen ATP, ADP, AMP, zyklischem AMP und Adenosin besteht (vgl. Tab. 6), scheint für die Wirkung als kleinste Einheit das Adenosinmolekül nötig zu sein.

Adenin, Ribose oder Adenin und Ribose zusammen üben keine Wirkung auf die Lipolyse aus. Das Fettgewebe ist offenbar nicht fähig, aus Adenin und Ribose Adenosin aufzubauen.

Ob die Nucleotide als Hemmstoffe der Lipolyse eine physiologische Bedeutung haben, ist ungewiß. Die Konzentration dieser Substanzen ist im Blut bedeutend geringer als in den in vitro am Fettgewebe wirksamen Konzentrationen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei großen, nekrotisierenden Tumoren, die mit Hypoglykämie einhergehen, Nucleotide und Ribonucleinsäuren vermehrt ins Blut gelangen, die Freisetzung der FFS herabsetzen und damit den Glucoseverbrauch indirekt steigern [12].

Als Pharmaka zur Senkung der freien Fettsäuren im Blut sind Nucleoside und Nucleotide wegen der sehr kurzen biologischen Halbwertszeit und der beträchtlichen Nebenwirkungen wohl kaum geeignet. Durch die verschieden starke Wirkung dieser Substanzen werden indessen ganz neue Perspektiven der Erforschung ihrer Wirkungsweise auf molekularer Ebene, der lipolytischen Vorgänge im Fettgewebe selbst und damit vielleicht eines an der Entstehung des Diabetes mellitus ursächlich beteiligten Prozesses eröffnet.

Literatur

- [1] BALLY, P.R., G.F. CAHILL Jr., B. LEBOEUF and A.E. RENOLD: The action of glucose and insulin on the uptake of unesterified palmitic acid into adipose tissue. *Helv. med. Acta* **26**, 691 (1959).
- [2] BERGMAYER, H.U., und E. BERNT: in Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, p. 123, 1962.
- [3] BUBLITZ, C., and E.P. KENNEDY: Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria: III. The enzymatic phosphorylation of glycerol. *J. biol. Chem.* **211**, 951 (1954).
- [4] CARLSON, L.A., and P.R. BALLY: Inhibition of lipid mobilization, In Renold, A.E., und G.F. Cahill, Jr.: Handbook of physiology, section 5, adipose tissue. American Physiological Society, Washington, D.C., p. 557, 1965.
- [5] DOLE, V.P.: Effect of nucleic acid metabolites on lipolysis in adipose tissue. *J. biol. Chem.* **236**, 3125 (1961).
- [6] — Insulin-like actions of ribonucleic acid, adenylic acid and adenosine. *J. biol. Chem.* **237**, 2758 (1962).
- [7] FOLCH, J., M. LEES and G.H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
- [8] FRERICH, H., and E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XI. Activation of phosphorylase by agents which stimulate lipolysis. *Biochemistry* **1**, 501 (1962).
- [9] FROESCH, E.R., H. BÜRGI, E.B. RAMSEIER, P.R. BALLY and A. LABHART: Antibody-suppressible and non suppressible insulinlike activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. clin. Invest.* **42**, 1816 (1963).
- [10] — — P.R. BALLY and A. LABHART: Inhibition of spontaneous adipose tissue lipolysis by insulin and effects on fructose and glucose metabolism. *Mol. Pharmacology*, in press.
- [11] — P.R. BALLY, U. GUHL, E. RAMSEIER und A. LABHART: Die Wirkung des Glucagons auf das Fettgewebe. *Schweiz. med. Wschr.* **90**, 1329 (1960).
- [12] — H. BÜRGI, W. ZIEGLER, P. BALLY und A. LABHART: Zur Pathogenese der tumorbedingten Hypoglykämie ohne Hyperinsulinismus. *Schweiz. med. Wschr.* **36**, 1250 (1963).
- [13] GORDON, R.S., Jr.: Unesterified fatty acids in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acids. *J. clin. Invest.* **36**, 810 (1957).
- [14] HAESSLER, H.A., and K.J. ISSELBACHER: Glycerokinase and its relation to intestinal metabolism. *Fed. Proc.* **22**, No. 2, Part I, p. 357, 1963.
- [15] HIRSCH, J., J.W. FARQUHAR, E.H. AHRENS, M.L. PETERSON and W. STOFFEL: Studies of adipose tissue in man: A microtechnique for sampling and analysis. *Amer. J. clin. Nutr.* **8**, 499 (1960).
- [16] HUMMEL, R.E.: Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Ratten-Fettgewebe in vitro. *Experientia* **15/7**, 256 (1959).
- [17] JUNGAS, R.L., and E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XII. The effects of insulin and epinephrine on free fatty acid and glycerol production in the presence and absence of glucose. *Biochemistry* **2**, 383 (1962).
- [18] KENNEDY, E.P.: Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. *J. biol. Chem.* **201**, 399 (1953).
- [19] KORNBERG, A., and W.E. PRICER, Jr.: Enzymatic esterification of alpha-glycerophosphate by long chain fatty acids. *J. biol. Chem.* **204**, 345 (1953).
- [20] LEBOEUF, B.: Regulation of fatty acid esterification in adipose tissue incubated in vitro. In Renold, A.E., and G.F. Cahill, Jr.: Handbook of physiology, section 5, adipose tissue. American Physiological Society, Washington, D.C., p. 385, 1965.
- [21] MARGOLIS, S., and M. VAUGHAN: Alpha-glycerophosphate synthesis and breakdown in homogenates of adipose tissue. *J. biol. Chem.* **237**, 44 (1962).
- [22] RANDLE, P.J., P.B. GARLAND, C.N. HALES and E.A. NEWSHOLME: The glucose fatty acid cycle and diabetes mellitus. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology **15**, 192 (1964).
- [23] SHAFFRIR, E., and S. KERPEL: Fatty acid esterification and release as related to the carbohydrate metabolism of adipose tissue: effect of epinephrine, cortisone and adrenalectomy. *Arch. Biochem.* **105**, 237 (1964).
- [24] STEIN, Y., and B. SHAPIRO: Glyceride synthesis by microsome fractions of rat liver. *Biochim. biophys. Acta* **30**, 271 (1958).
- [25] STEINBERG, D., and M. VAUGHAN: Release of free fatty acids from adipose tissue in vitro in relation to rates of triglyceride synthesis and degradation. In Renold, A.E., und G.F. Cahill, Jr.: Handbook of physiology, section 5, adipose tissue. American Physiological Society, Washington, D.C., p. 334, 1965.
- [26] — — and S. MARGOLIS: Studies of triglyceride biosynthesis in homogenates of adipose tissue. *J. biol. Chem.* **236**, 1631 (1961).
- [27] TARRANT, M.E., R. MAHLER and J. ASHMORE: Studies in experimental diabetes: IV. Free fatty acid mobilization. *J. biol. Chem.* **239**, 1714 (1964).
- [28] TREBLE, D.H., and E.G. BALL: The occurrence of glycerokinase in rat brown adipose tissue. *Fed. Proc.* **22**, No. 2, Part I, p. 357, 1963.
- [29] UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS and S.F. STAUFFER: In Manometric techniques, 3rd ed., Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 123, 1962.
- [30] VAUGHAN, M.: The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *J. biol. Chem.* **237**, 3354 (1962).

- [31] —, and D. STEINBERG: Glyceride biosynthesis, glyceride breakdown and glykogen breakdown in adipose tissue: mechanisms and regulation. In Renold, A.E., and G.F. Cahill, Jr.: Handbook of physiology, section 5, adipose tissue, American Physiological Society, Washington, D.C., p. 239, 1965.
- [32] WIELAND, O.: Eine enzymatische Methode zur

- Bestimmung von Glycerin. Biochem. Z. **329**, 313 (1957).
- [33] —, and M. SUYTER: Glycerokinase. Its isolation and properties. Biochem. Z. **329**, 313 (1957).

Dr. H. KAPPELER
Stoffwechselabt. d. Med. Universitätsklinik
Zürich/Schweiz

Curriculum vitae

Am 29. Mai 1933 wurde ich in Frauenfeld geboren. Die Primarschule besuchte ich in Mogelsberg, das Gymnasium in Einsiedeln, wo ich 1954 mit Matura Typus A abschloss.

Im Herbst 1954 begann ich das Medizinstudium an der Universität Freiburg. Die klinischen Semester absolvierte ich in Genf, Paris, Wien und Zürich, wo ich im Frühjahr 1961 das Eidgenössische Staatsexamen bestand. Vom Sommer 1961 bis zum Frühjahr 1964 arbeitete ich im Stoffwechsel-labor der Medizinischen Klinik der Universität Zürich, seit dem Frühjahr 1964 auf der Medizinischen Klinik des Bürgerspitals Solothurn.

